

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-513633

(P2003-513633A)

(43) 公表日 平成15年4月15日 (2003. 4. 15)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 35/54	4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/54		35/76	4 B 0 6 5
35/76		48/00	4 C 0 8 4
48/00		A 6 1 P 11/00	4 C 0 8 7
A 6 1 P 11/00		43/00	1 0 1
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 43 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-535580(P2001-535580)
 (86) (22) 出願日 平成12年11月2日 (2000. 11. 2)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年4月26日 (2002. 4. 26)
 (86) 国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 7 7 3 7
 (87) 国際公開番号 W O 0 1 / 0 3 2 8 9 8
 (87) 国際公開日 平成13年5月10日 (2001. 5. 10)
 (31) 優先権主張番号 6 0 / 1 6 3 , 0 5 5
 (32) 優先日 平成11年11月2日 (1999. 11. 2)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)
 (31) 優先権主張番号 特願平11-359218
 (32) 優先日 平成11年12月17日 (1999. 12. 17)
 (33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 株式会社ディナベック研究所
 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号
 (72) 発明者 米満 吉和
 福岡県福岡市東区馬出3丁目1番1号 九州大学医学部内
 (72) 発明者 長谷川 颯
 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社ディナベック研究所内
 (74) 代理人 弁理士 清水 初志 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 気道上皮細胞への外因性遺伝子導入用組換えセンダイウイルスベクター

(57) 【要約】

気道上皮細胞への外因性遺伝子導入用組換えセンダイウイルスベクター及びそのベクターを用いた外因性遺伝子導入方法を提供する。組換えセンダイウイルスベクターは、粘液で覆われた無処理の気道上皮細胞に短時間接触させるだけで効率よく遺伝子を導入することが可能である。さらに、本ベクターは細胞の先端表面だけでなく、CFTRが主として発現している粘膜下組織腺にも遺伝子を導入することができる。したがって、本ベクターはCFTRが欠損している疾患であるCFに対する遺伝子治療に使用することが可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 外因性遺伝子を保持する組換えセンダイウイルスベクターを含む、気道上皮細胞への外因性遺伝子導入用組成物。

【請求項2】 センダイウイルスベクターがF遺伝子、HN遺伝子、およびM遺伝子の少なくともひとつを含まない、請求項1記載の組成物。

【請求項3】 鶏卵漿尿液をさらに含む請求項1または2記載の組成物。

【請求項4】 嚢胞性線維症の治療のための、請求項1～3のいずれか一項記載の組成物。

【請求項5】 外因性遺伝子が、嚢胞性線維症膜貫通伝導性制御因子（CFTR）遺伝子、またはCFTRと同等の機能を有するタンパク質をコードする該遺伝子の誘導体である、請求項1から4のいずれか一項記載の組成物。

【請求項6】 外因性遺伝子を保持する組換えセンダイウイルスベクターを含む組成物を粘液に被覆された気道上皮細胞に接触させることを含む、気道上皮細胞への外因性遺伝子導入方法。

【請求項7】 センダイウイルスベクターがF遺伝子、HN遺伝子、およびM遺伝子の少なくともひとつを含まない、請求項6記載の方法。

【請求項8】 組成物が鶏卵漿尿液をさらに含む、請求項6または7記載の方法。

【請求項9】 外因性遺伝子が、嚢胞性線維症膜貫通伝導性制御因子（CFTR）をコードする遺伝子、またはCFTRと同等の機能を有するタンパク質をコードする該遺伝子の誘導体である、請求項6～8のいずれか一項記載の方法。

【請求項10】 気道上皮細胞が、鼻腔、喉頭、気管または肺中の誘導気道またはガス交換面に存在する、請求項6～9のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明は、気道上皮細胞への外因性遺伝子導入用組換えセンダイウイルスベクター及びそのベクターを用いた外因性遺伝子導入方法に関する。

【0002】

背景技術

分子クローニング技術の進歩に伴い、その変異が重要なヒトの疾患を引き起こしている多くの遺伝子が同定及び単離されている。ヒト患者において、欠損または変異を起こしている遺伝子をエクスピボ技術によって置き換えることが可能であり、これは、インビトロでDNAそのもの、リボソームに包含されたDNA、または適当な染色体組み込み型のベクターで細胞を形質転換して、宿主器官に導入することによって実施される（エクスピボ遺伝子治療）。

【0003】

遺伝子治療は、所望の遺伝子を被験者に導入し、それをインビボで発現させる治療手段を提供する。遺伝子導入は、被験者の細胞または組織をエクスピボで形質転換し、形質転換体を宿主に再び導入することにより実施される。遺伝子を直接被験者に投与することも可能である。

【0004】

Nabelら (Science (1990) 249: 1285-1288) は、 β -gal発現プラスミドを含むリボソームを用いてブタの動脈内でのインビボによる形質転換を行い、動脈壁での部位特異的な遺伝子発現を観察した。エクスピボ治療には、いくつかの欠点がある。例えば、分化した複製している細胞のみが形質転換された場合、それらの細胞が成熟し、死に至れば、導入された遺伝子の機能は失われてしまう。また、エクスピボ法では、限られた数の細胞を形質転換させることはできるが、最初に体内から取り出された細胞しか形質転換させることはできない。

【0005】

このように遺伝子治療においては、導入すべき遺伝子、導入遺伝子を発現させる標的細胞、標的組織に適した遺伝子導入方法、投与経路を適切に選択すること

が極めて重要である。

【0006】

嚢胞性繊維症 (cystic fibrosis; CF) は、先天的代謝異常を起こす常染色体劣性遺伝病である。CF患者は欧米で高頻度で見られ、2,000~2,500人に1人の頻度で本疾患に罹患している。主な症状として、肺、気道、膵臓、肝臓、および小腸などの臓器において、外分泌異常による粘液性分泌物が貯留する。CFの現行治療は、肺移植および肺感染症の抗生物質治療を中心に行われているが、特に肺の感染症は致命的である。

【0007】

CFの原因遺伝子である嚢胞性線維症膜貫通伝導性制御因子 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; CFTR) 遺伝子が明らかにされており (Riordan, J.R.ら, Science 245: 1066-1073, 1989)、正常なCFTR遺伝子を有するベクターを気道上皮細胞に導入する、CFの遺伝子治療の開発が期待されている。肺及び上気道にエキスポ治療を適用することができないため、CFの遺伝子治療において外因性遺伝子はインビボで導入されると思われる。

【0008】

肺へのベクター投与に関しては、以下のような試みがなされている。Hazinskiら (Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. (1991) 4: 206-209) は、齧歯類動物の無傷の肺へのリポソームを介したDNAの導入を開示している。カチオン性リポソームと、3つの遺伝子から構成される融合遺伝子、すなわち(1)ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーターに連結しているクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子、(2)マウス乳ガンウイルス (MMTV) プロモーターに連結しているCAT遺伝子、及び(3)サイトメガロウイルス- β -ガラクトシダーゼ (CMV- β -gal) 融合遺伝子、とを複合体化させた。このリポソーム/DNA複合体をラットの頸部気管に投与し、検出可能な程度の遺伝子発現を観察した。

【0009】

Brighamら (Am. J. Med. Sci. (1989) 298: 278-281) はリポソーム媒体を介

したCAT遺伝子のマウス肺へのインビボ形質転換を開示している。静脈内、気管内、または腹腔内注射により形質転換が行われた。静脈内及び気管内投与では肺でのCAT遺伝子発現が見られたが、腹腔内投与では見られなかった。

【0010】

Canonicaら (Clin. Res. (1991) 39:219A) はウシ肺上皮培養細胞でのCMVプロモーターの支配下にあるヒト α -1アンチトリプシン遺伝子の発現を記載している。遺伝子はリポソームを介して培養細胞に導入された。リポソームと複合体化した遺伝子構築物を静脈内投与したニュージーランド白兎の肺組織切片において、 α -1アンチトリプシンの存在が検出された。

【0011】

さらに、米国特許第5,958,893号は、アデノウイルスベクターやカチオン性リポソームのような現在利用可能なベクターを使用して、低分子量化したCFTRをコードする遺伝子の導入方法を開示している。

【0012】

しかしながら、アデノウイルスを介して遺伝子を気道上皮細胞へ導入した場合、遺伝子導入効率が低いことが報告されている。気道上皮細胞の先端表面にアデノウイルスのレセプターである $\alpha\beta\gamma$ 3インテグリン及びCAR受容体の両方が存在しないため、先端原形質膜へのアデノウイルス粒子の取り込み速度が低いことがその原因と考えられている (Goldman, M.ら, Gene Ther. 3: 811-818, 1996, Boucher, R.C., J. Clin. Invest 103: 441-445, 1999)。また、カチオン性リポソームを用いた場合は、気道粘液がその取り込みを妨げており、粘膜を取り除くことによって遺伝子導入効率を上げることができると報告されている (Kitson, C.ら, Gene Ther. 6: 534-546, 1999, Zabner, J.ら, J. Biol. Chem. 270: 18997-19007, 1995, Fasbender, A.ら, Gene Ther. 4: 1173-1180, 1997)。

【0013】

現在まで、気道上皮細胞に効率よく外因性遺伝子を導入できるベクター系また

は遺伝子導入方法は知られていない。したがって、気道上皮細胞へ効率よく遺伝子導入を行うためのベクターの開発が切望されている。

【0014】

パラミクソウイルス科に属するセンダイウイルスは、遺伝子導入用ベクターとして非常に有用であり、その開発が進められている。(Kato, A.ら, EMBO J. 16: 578-598, 1997, 国際公開公報第97/16538号、国際公開公報第97/16539号)。センダイウイルスベクターは毒性が低く、導入された遺伝子は極めて高レベルで発現される。また、ウイルスベクター内の遺伝子挿入物が宿主染色体へ導入されることがないため、安全性にも優れている。センダイウイルスベクターの形質転換能がアデノウイルスのものとは異なることが示されている (Goldman, M.ら, Gene Ther. 3: 811-818, 1996, Boucher, R.C., J. Clin. Invest 103: 441-445, 1999)。例えば、アデノウイルスは損傷していない部位に比べ、損傷部位に感染しやすい (Kiston, C.ら, Gene Ther. 6: 534-546, 1999, Zabner, J.ら, J. Biol. Chem. 270: 18997-19007, 1995, Fasbender, A.ら, Gene Ther. 4: 1173-1180, 1997)。これらの報告により、センダイウイルスベクターがアデノウイルスの欠点を相補することが示唆される。

【0015】

発明の開示

本発明は、気道上皮細胞への外因性遺伝子導入用ベクターおよびそのベクターを用いた外因性遺伝子導入方法を提供することを課題とする。

【0016】

本発明者らは、外因性遺伝子を保持する組換えセンダイウイルスベクター、アデノウイルスベクター及びカチオン性脂質複合体のインビトロ及びインビボにおける種々の動物由来の気道上皮細胞への遺伝子導入効率を調べた。その結果、アデノウイルスベクター及びカチオン性脂質複合体に比べ、組換えセンダイウイルスベクターの気道上皮細胞への外因性遺伝子導入効率が顕著に優れていることを見出した。

【0017】

また、本発明者らは、組換えセンダイウイルスベクターにより、許容性のマウス気道だけでなく、大型の動物である非許容性のケナガイタチ、ヒツジ、及びヒトの気道上皮細胞へ外因性遺伝子を効率よく形質転換できることを見出した。さらに、上皮細胞の先端表面だけでなく、無傷の粘膜下組織腺にも感染することを見出した。これらの所見を基にして本発明を完成した。

【0018】

具体的には、本発明は、外因性遺伝子を保持する組換えセンダイウイルスベクターを含む、気道上皮細胞への外因性遺伝子導入用組成物に関する。

【0019】

また、本発明は、外因性遺伝子を保持する組換えセンダイウイルスベクターを含む組成物を粘液に被覆された気道上皮細胞に接触させることを含む、気道上皮細胞への外因性遺伝子導入方法を提供する。

【0020】

以下に本発明をより詳細に説明する。

【0021】

本明細書において、「組換えセンダイウイルスベクター」とは組換えセンダイウイルスcDNAよりウイルス及びウイルス様粒子を再構成したものを意味し、組換えセンダイウイルスRNAと感染力を有するセンダイウイルスの構造部分を含む。ここで、「感染力」という用語は、ウイルスと細胞との接着能を介して細胞の内部に核酸等を導入する能力、およびウイルスの膜と宿主細胞膜との融合を含む様々なメカニズムを介して細胞の内部に導入する能力を意味する。組換えセンダイウイルスベクターはリボ核タンパク質 (RNP) であってもよい。

【0022】

「遺伝子」とはRNA及びcDNAを含む。

【0023】

「気道上皮細胞」とは、多列繊毛上皮細胞の他に、杯細胞及びクララ細胞を意味し、これらは、鼻腔、喉頭、気管もしくは任意の誘導気道における気道の内面に存在するか、または肺におけるI型及びII型肺胞細胞を含むガス交換肺胞表

面上に存在する。

【0024】

本発明に用いられる組換えセンダイウイルスベクターは、組換えセンダイウイルス遺伝子を保持する。天然型センダイウイルスのゲノムは、3'の短いリーダー領域に続き、ヌクレオキャプシド (N) 遺伝子、ホスホ (P) 遺伝子、マトリックス (M) 遺伝子、フュージョン (F) 遺伝子、ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ (HN) 遺伝子、およびラージ (L) 遺伝子、および短い5'トレイラー領域をこの順序で含んでいる。

【0025】

組換えセンダイウイルスベクターを作成するための出発材料となるセンダイウイルス遺伝子は、再構成された組換えセンダイウイルスベクターが気道上皮細胞に感染して、ベクターが保持する外因性遺伝子を感染した細胞において発現できるかぎり、欠失または改変されていてもよい。例えば、DI粒子 (J. Virol. 68: 8413-8417, 1994) などの不完全ウイルスを用いることも可能である。

【0026】

また、遺伝子治療のためには、組換えセンダイウイルスベクターが感染力を有しているが、伝播力を欠如していることが好ましい。伝播力を欠如させるためには、F遺伝子、HN遺伝子、およびM遺伝子の少なくともひとつを欠失させておくことが好ましい。そのようなベクターには、例えば、F遺伝子が欠失したセンダイウイルス Z 株の遺伝子が含まれる。さらなる例として、pSeV18⁺b(+)(Yu, D.ら, Genes to Cells 2: 457-466, 1997)またはpSeV(+)(Kato, A.ら, EMBO J. 16: 578-587, 1997) が挙げられる。

【0027】

組換えセンダイウイルス遺伝子は、上記のセンダイウイルス遺伝子に外因性遺伝子を挿入することによって得られる。標的とする気道上皮細胞において発現させたいタンパク質をコードする限り、任意の外因性遺伝子を使用することができる。例えば、CFの遺伝子治療のためには、CFの原因遺伝子であるCFTR遺伝子

(Riordan,

J.R.ら, Science 245: 1066-1073, 1989) が用いられる。外因性遺伝子は天然型タンパク質をコードする遺伝子であってもよく、また欠失、置換または挿入により改変された上記遺伝子であって、且つ天然型タンパク質と同等の機能を有するタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。例えば、改変されたCFTR遺伝子は米国特許第5,958,893号に開示されている。その他の外因性遺伝子の例としては、 α -1アンチトリプシン (Longら, Biochem. 23:4828-2837, 1984)、DNase、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、カタラーゼ等をコードする遺伝子が挙げられる。

【0028】

外因性遺伝子を有する組換えセンダイウイルスベクターは、例えば、Kato, A.ら (1997, EMBO J. 16: 578-587) 及びYu, D.ら (1997, Genes Cells 2: 457-466) の記載に基づいて、次のようにして構築することができる。

【0029】

まず、所望の遺伝子のcDNA塩基配列を含むDNA試料を用意する。DNA試料は、25 ng/ μ l以上の濃度で電気泳動的に単一のプラスミドと確認できることが好ましい。但し、目的とするcDNA配列の中にNotI認識部位が含まれる場合は、予め除去しておく。この試料から所望の遺伝子断片を増幅回収するために、NotI制限酵素切断部位配列；後述する転写終結配列 (E)、介在配列 (I)、及び転写開始配列 (S) 配列；並びに目的遺伝子の一部の配列、を含むプライマー対として、フォワード側合成DNA配列及びリバース側合成DNA配列 (アンチセンス鎖) を作成する。

【0030】

フォワード側合成DNA配列は5'側から任意の2個以上のオリゴDNA、好ましくはGCG、GCCのNotI認識部位由来の配列が含まれない4塩基、更に好ましくはACTTを選択し、その3'側にNotI認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3'側にスパーサー配列として任意の9塩基または9に6の倍数を加えた数の塩基を付加する。さらにその3'側に所望のcDNAの開始コドンATGからATGを含めてORFの25塩基相当の配列を付加する。但しフォワード側合成オリゴDNAの3'末端がGまたはCのいずれ

れかとなるように、所望のcDNAから25塩基近傍を選択する。

【0031】

リバーズ側合成DNA配列は5'側から任意の2個以上のオリゴDNA、好ましくはGC G及びGCCのNotI認識部位由来の配列が含まれない、4塩基、更に好ましくはATCCを選択し、その3'側にNotI認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3'側に長さを調節するための挿入断片のオリゴDNAを付加する。このオリゴDNAの長さは、NotI認識部位gcggccgcを含め、cDNAの相補鎖塩基数と後述するセンダイウイルスに由来するセンダイウイルスゲノムのEIS塩基数の合計が6の倍数になるように設計する（いわゆる「6のルール (rule of six)」; Kolakofski, D.ら, J. Virol. 72:891-899, 1998, Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67:4822-4830, 1993)。挿入断片の3'側に、センダイウイルスのS配列の相補鎖配列、好ましくは5'-CTTTCACCT-3'、I配列、好ましくは5'-AAG-3'、及びE配列の相補鎖配列、好ましくは5'-TTTTCTTACTACGG-3'、所望のcDNA配列の終始コドンから逆に数えて25塩基相当の最後がGまたはCのいずれかになるような相補配列を付加することによって、リバーズ側合成オリゴDNAの3'末端を調製する。

【0032】

PCRは、ExTaqポリメラーゼ（宝酒造）を用いる通常の方法を用いることができる。好ましくはVentポリメラーゼ（NEB）を用いて行い、増幅した目的断片はNotIで消化した後、プラスミドベクターpBluescriptのNotI部位に挿入する。得られたPCR産物の塩基配列をシーケンサーで確認し、正しい配列のプラスミドを選択する。これをNotIで切断しセンダイウイルスのゲノムcDNAプラスミド、例えば、pSeV18⁺ b(+)(Yu, D.ら, Genes to Cells 2: 457-466, 1997)またはpSeV(+)(Kato, A.ら, EMBO J. 16: 578-587, 1997)、のNotI部位に挿入し、外因性cDNAが組込まれた組換えセンダイウイルスcDNAを得る。またプラスミドベクターpBluescriptを介さずにNotI部位に直接挿入し、組換えセンダイウイルスcDNAを得ることも可能である。

【0033】

上記のようにして作製した組換えセンダイウイルスcDNAをインビトロまたは細胞内で転写させ、ウイルスを再構成させることによって、組換えウイルスベクターを得ることができる。cDNAからのウイルスの再構成は公知の方法を用いて行うことができる（国際公開公報第97/16538号、国際公開公報第97/16539号）。

【0034】

cDNAからの再構成は次のようにして行うことができる。

【0035】

6穴のプラスチックプレート上で、10%ウシ胎児血清(FCS)および抗生物質(100 units/ml ペニシリンGおよび100 μ g/ml ストレプトマイシン)を含む最少必須培地(MEM)を用いてサル腎臓由来細胞株LLCMK2を70~80%コンフルエント(1 $\times 10^6$ 細胞)になるまで培養した。この細胞に、T7ポリメラーゼを発現するUV照射により不活化した組換えワクシニアウイルスVTF7-3 (Fuerst, T.R.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986、Kato, A.ら, Genes Cells 1: 569-579, 1996) を2 PFU/細胞で感染させる。感染1時間後、60~2 μ g、より好ましくは3~5 μ gの上記の組換えセンダイウイルスcDNAを、全長センダイウイルスゲノムの生成に必須なトランスに作用するウイルスタンパク質を発現するプラスミド(24~0.5 μ gのpGEM-N、12~0.25 μ gのpGEM-P、および24~0.5 μ gのpGEM-L、より好ましくは1 μ gのpGEM-N、0.5 μ gのpGEM-P、および1 μ gのpGEM-L) (Kato, A.ら, Genes Cells 1: 569-579, 1996) と共にSuperfect (QIAGEN社)を用いたリポフェクション法等のトランスフェクション法によってトランスフェクションする。トランスフェクションを行った細胞は、100 μ g/mlのリファンピシン(Sigma)及びシトシンアラビノシド(AraC)、より好ましくは40 μ g/mlのシトシンアラビノシド(AraC) (Sigma)を含む血清不含のMEMで培養し、ワクシニアウイルスによる細胞毒性を最少にとどめ、ウイルスの回収率を最大にするように薬剤の最適濃度を設定する(Kato, A.ら, Genes Cells 1: 569-579, 1996)。トランスフェクションから48時間後、細胞を回収し、凍結融解を3回繰り返して細胞を破碎した後、10日齢の発育鶏卵

の漿尿膜内へ接種する。3日後、漿尿液を回収し、ウイルス力価は赤血球凝集活性(HA)を測定することにより決定する。HAは「エンドポイント (endo-point) 希釈法」(Kato,

A.ら, Genes Cells 1: 569-579, 1996) により決定することができる。HAが確認されなかった試料は、さらに発育鶏卵に試料を接種する。回収されるセンダイウイルスの力価は $10^8 \sim 10^9$

PFU/mlであり、共に含まれていたワクシニアウイルスvTF7-3は $10^3 \sim 10^4$ PFU/ml以下である。試料を 10^6 倍に希釈し鶏卵で再増幅させ、ワクシニアウイルスを除去する。この2回目または3回目の発育鶏卵における継代で得られた組換えウイルスを保存し、所望のcDNAが組込まれた組換えセンダイウイルスベクターを得る。保存ウイルスのプラーク形成能は、一般的に 10^9

PFU/mlまたは10,240 HA unit/mlの力価を有し、ウイルスを -80°C で保存すると力価が維持されると考えられる。

【0036】

組換えセンダイウイルスcDNAが細胞内で再構成する限り、再構成に用いる宿主細胞は特に制限されない。宿主として使用される細胞株には、LLCM2細胞およびヒト由来の細胞の他に、サル腎臓由来のCV-1細胞や、ハムスター腎臓由来のBHK細胞などの培養細胞を使うことができる。

【0037】

再構成した組換えセンダイウイルスは、そのエンベローブ表面に特定の細胞に接着しうるように、接着因子、リガンド、受容体等が結合していてもよい。

【0038】

本発明の組換えセンダイウイルスベクター含有組成物としては、上記のウイルスベクターを含んだ漿尿液を使用することができる。

【0039】

本発明の組成物には、脱イオン水、5%デキストロース水溶液等の生理学的に許容しうる媒体を含んでいてもよい。安定剤、殺生物剤等のその他の助剤が含有されていてもよい。さらに、組換えセンダイウイルスベクター含有組成物は凍結乾燥物として製剤化されていてもよい。その場合、上述の助剤に加えて、アルブミ

ン、プリオネクス (Prionex (登録商標)、ペンタファームジャパン) 等の安定化剤を含有していてもよい。

【0040】

組換えセンダイウイルスベクター含有組成物を粘膜に被覆された気道上皮細胞に接触させることで、組換えセンダイウイルスに含有されている外因性遺伝子を気道上皮細胞へ導入することができる。カチオン性脂質を気道上皮細胞への遺伝子導入に使用する場合は、気道粘液がカチオン性脂質の遺伝子導入の深刻な障害となるため、外因性遺伝子を導入するためには粘液を取り除かなければならない。これに対して、本発明のセンダイウイルス含有組成物は粘液に覆われたままの気道上皮細胞に接触させるだけで、外因性遺伝子を容易に導入することができる。

【0041】

本発明の外因性遺伝子導入方法は、気道上皮細胞の疾患を治療することが期待される外因性遺伝子または細胞内に不足しているタンパク質の内因性遺伝子を発現させるための遺伝子治療に有用である。例えば、CFTR遺伝子を含む本発明のウイルスベクター含有組成物はCFの治療に有効である。遺伝子治療は、患部の気道上皮細胞に本発明のウイルスベクター含有組成物をインビボまたはエキスビボによって投与し、外因性遺伝子を細胞内で発現させることにより、実施することができる。インビボによる遺伝子導入は例えば、鼻腔、肺等への滴下、ネブライザーを用いた吸入等の局所投与により行うことができる。ネブライザーの例としては、喘息の治療に通常用いられている市販のものが含まれる。

【0042】

本発明のウイルス含有組成物は、ヒト、マウス、ウサギ、ヒツジ、ウシ、サルなど任意の哺乳動物に適用することができる。

【0043】

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明の実施例を記載するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0044】

実施例1

組換えセンダイウイルスベクターの構築および再構成

組換えセンダイウイルスは公知の方法に準じて構築した (Kato, A.ら, EMBO J. 16: 578-598, 1997, Hasan, M.K.ら, J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997)。まず、NotI制限部位を有する18bpのスペーサー配列 (5'-(G)-CGGCCG CAGATCTT CACG-3') を、クローニングされたセンダイウイルスゲノムcDNA (pSeV(+)) のリーダー配列とN-タンパク質をコードする配列の5'末端との間の隣接遺伝子座に挿入し、肝炎デルタウイルスのアンチゲノム鎖 (antigenomic strand) 由来の自己開裂リボザイム部位を含むプラスミドpSeV18⁺ b(+)を得た。核移行シグナルを含む大腸菌LacZ、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、および大腸菌LacZのcDNA全体を、NotI部位および外因性遺伝子のためのセンダイウイルスEおよびSシグナル配列タグの新たなセットを含むプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、クローニングされたゲノムのNotI部位に挿入した。外因性遺伝子を含む鋳型センダイウイルスゲノムの全長を複数の6ヌクレオチドに再編成した。外因性遺伝子を含む鋳型センダイウイルスゲノム、N-タンパク質、P-タンパク質、およびL-タンパク質をコードするプラスミド (pGEM-N、pGEM-P、pGEM-L) を、市販のカチオン性脂質GL-67-DOPE-PEG (Genzyme Co. Ltd.) と複合体化し、ワクシニアウイルスVT7-3 (Fuerst, T.R.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986, Kato, A.ら, Genes Cells 1: 569-579, 1996) と共にLLCMK2細胞に形質転換した。40時間後、凍結および解凍を3回繰り返すことにより細胞を破壊し、10日齢の発育鶏卵の漿尿膜内に注入した。その後、ウイルスを回収し、卵における継代によりワクシニアウイルスを除去した。ニワトリ赤血球を用いた赤血球凝集活性 (HA) (Kato, A.ら, Genes Cells 1: 569-579, 1996) によりウイルス力価を決定し、ウイルスを含む漿尿液を本発明の組換えセンダイウイルスベクター含有組成物として、使用直前まで-80℃で保存した。

【0045】

実施例 2

鼻腔滴注または鼻腔灌流によるマウスの鼻腔および肺へのインビボ遺伝子導入

2-1. センダイウイルスベクターとカチオン性脂質との比較

pGL3-対照ベクター (Promega) のHindIII-BamHI断片をヒト・サイトメガロウイルス・イミディエート・アーリー (CMV-IE) プロモーターの支配下にあるpcDNA3 (Invitrogen) のマルチクローニング・サイトに挿入することによりpCMV-ルシフェラーゼを構築した。pCMV-ルシフェラーゼをGL-67-DOPE-PEG (Genzyme Co. Ltd.) と複合体化し、GL-67-pCMV-lucを得た。

【0046】

肺へのベクターの遺伝子導入効率及び接触時間の遺伝子導入効率に与える影響を調べるため、鼻腔内への滴注及び灌流により各ベクターを投与した。まず、雄balb/cマウス (6~8週齢) の鼻腔内に、 $100\mu\text{l}$ の種々の濃度の実施例1で得られたルシフェラーゼ遺伝子を含むセンダイウイルスベクター (SeV-luc) またはGL-67-pCMV-luc ($80\mu\text{g}$ DNA/匹) を公知の方法 (Yonemitsu, Y.ら, Gene Ther. 4: 631-638, 1997) に従い、滴注した。

【0047】

鼻腔灌流は、カテーテルを5mm鼻腔内に挿入し、ペリスタリック・ポンプ (P-1型、Pharmacia Biotech) を用いて各 $150\mu\text{l}$ の上記のベクター溶液を5から $6\mu\text{l}/$ 分の速度で灌流することにより実施した。遺伝子導入処理の2日後、過剰量のペントバルビタールを腹腔内に注射することにより、麻酔下でマウスを屠殺した。鼻甲介、気管、および肺を摘出し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

【0048】

対照として、外因性遺伝子を実施例1に記載のpSeV18⁺b(+)を用いて、上記と同様に遺伝子導入処理を行った。以下の実施例においても対照としてpSeV18⁺b(+)を用いた。

【0049】

ルシフェラーゼ活性は、公知の方法 (Yonemitsu, Y.ら, Gene Ther. 4: 631-638, 1997) に従って、以下のようにして測定した。まず、組織をPBSで洗浄し、

プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む1×溶解用緩衝液中でハサミで切り刻み、4℃で、13,000rpmで10分間遠心分離し、30 μ lの上清を100 μ lのルシフェラーゼ活性測定用緩衝液 (Promega) に添加した。20℃で10秒間ブレインキュベーションした後すぐに10秒の積分で光の強度をターナーTD20eルミノメーター (Turner TD20e luminometer) (Turner Co.) により測定した。この条件で、1pgの組換えルシフェラーゼ (Promega) は、 2.6×10^4 RLUと等しかった。タンパク質濃度は、市販のタンパク質アッセイ系 (Bio-Rad Laboratories Ltd., Hertfordshire, UK) を用いて、ウシ血清アルブミンに対応する標準曲線に従い、ブラッドフォード (Bradford) の方法により測定した。データは、RLU/mgタンパク質として表し、各サンプルは2回以上測定した。

【0050】

SeV-lucとGL-67-pCMV-lucの遺伝子導入効率と比較した結果を図1 (肺) 及び図2 (鼻) にそれぞれ示す。図1から明らかなように、SeV-lucで形質転換された肺は、用量依存的にGL-67-pCMV-lucよりも10,000倍以上高いルシフェラーゼ活性を示した。SeVによるルシフェラーゼ遺伝子発現量は、GL-67-pCMV-lucよりも接触時間の長さに関わらず、約10,000倍高いことが示された。これらの結果から、センダイウイルスベクターは単に気道上皮細胞に接触させるだけで、マウスの肺及び鼻に同様に遺伝子を効率よく導入できることがわかる。

【0051】

2-2. センダイウイルスベクターとアデノウイルスベクターとの比較

SeV-lucまたはルシフェラーゼ遺伝子を含むアデノウイルスベクター、AdCMV-luc (Ade-luc) (Kendall, J.M.ら, Cell Calcium 19: 133-142, 1996) を、実施例1と同様の方法でマウスの鼻腔内に滴注し、鼻甲介、気管、及び肺を切除し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

【0052】

また、シミアンウイルスラージT抗原の核移行シグナルとlacZ遺伝子を保持するセンダイウイルスベクター (SeV-NLS-lacZ) 及びアデノウイルスベクター (AdCMV-nls-lacZ) を調製し、上記2-1と同様の方法でマウスの鼻腔内に滴注した。気管支、気管、及び鼻甲介を切除し、それぞれの組織を0.25%グルタルアルデ

ヒド及び2%パラホルムアルデヒドを含む氷冷0.1M

PBS溶液で10分間固定し、回転振とうしながら室温で3時間、X-gal染色（溶液：5 mMシアン化カリウム第一鉄、5mM シアン化第二鉄、2mM 塩化マグネシウム、1mg/ml

5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド）した。X-gal染色された組織を再固定し、パラフィン包埋し、5 μ mの切片を光学顕微鏡下で調べた。結果を図3、4及び5に示す。

【0053】

図3に示すように、SeV-lucで形質転換した細胞はAde-lucで形質転換した細胞の5,000倍高い遺伝子発現を示した。

【0054】

X-gal陽性上皮細胞は、いずれのベクターで形質転換した場合も、同様の頻度で細気管支内で分布していた（図4）。一方、AdQW-nls-lacZで処理されたマウスの気管または鼻では青色細胞がほとんど検出されなかったが、SeV-NLS-lacZで処理されたマウスではX-gal陽性細胞が高頻度で観察された。図5に示すように、青色細胞は、繊毛を有する円柱細胞だけでなく、繊毛を有しない分泌細胞（NC）においても見られた。対照的に、基底細胞（BC）には青色シグナルは検出されなかった。

【0055】

これらの結果は、アデノウイルスベクターでは遺伝子を導入できない気道上皮細胞に対しても、センダイウイルスベクターを用いれば遺伝子を導入することが可能であることを示している。

【0056】

実施例3

ケナガイタチの肺への遺伝子導入

ケナガイタチ（体重500～600g）に麻酔をかけ、実施例2と同様にして、 3×10^8 または 3×10^9 pfu/mlの精製SeV-lacZを含むBSS溶液3mlを鼻腔内に投与した（各群についてn=3）。対照（n=2）には3mlのSeV-luc（ 10^9 pfu/ml）を投与した。感染の48時間後、ケナガイタチを屠殺し、インサイチューで気管にカニューレを挿

入し、氷冷固定液（2%ホルマリン、0.2%グルタルアルデヒド、2mM MgCl_2 、5mM EGTAを含むPBS溶液、pH7.3）で肺を膨張させた。気管および肺を一塊として切除し、実施例2と同様にして、X-gal染色を行った。各肺を、7つの部分、すなわち気管、4つの右葉〔上部（R1）、中央（R2、R3）および下部（R4）〕ならびに2つの左葉〔上部（L1）および下部（L2）〕に切り離し、気道上皮細胞および粘膜下組織腺中の β -Gal陽性細胞を、計数線付きのレンズを用いてポイント・カウンティング（point counting）により顕微鏡下で計数した。一つの気道当たりの青色細胞の割合を得るため、一つの気道につき10個の20倍拡大視野を調べ、肺葉の異なる領域（近位、中央、遠位）から無作為に採取された3個から8個の気道を各肺葉について調べた。変動係数（CV）として表される反復測定の変異（ERM）は、18%であった。同一動物内でのCVは、 3×10^8 pfu/mlを受容した動物では24%と43%の間、 3×10^9 pfu/mlを受容した動物では8%と14%の間であった。

【0057】

気道上皮細胞（図6A及び図7a及びb）及び粘膜下組織腺（図6B及び図7c）で用量依存的に β -ガラクトシダーゼ活性が見られた。粘膜下組織腺はCFTRの主な発現部位である。対照では全く活性は見られなかった（図7d）。

【0058】

実施例4

ヒト健常ドナーの鼻腔上皮細胞への遺伝子導入

ヒト健常ドナー（男性6名、女性3名）から鼻腔上皮細胞をブラッシングにより採取した。リン酸緩衝食塩水（PBS：137mM NaCl、3mM KCl、8mM Na_2HPO_4 、1mM KH_2PO_4 、pH7.2）で2回洗浄した後、細胞を10%ウシ胎児血清を含む培養培地（ダルベッコ改変イーグル培地；DMEM）に再懸濁させ、2群または3群に分割し、96穴培養プレートの各ウェルに播いた。鼻腔細胞の生存は、位相差顕微鏡による繊毛運動の観察およびトリパンブルー陽性細胞数の顕微鏡による計数により確認した。ベクター溶液、（SeV-luc及びGL-67-pCMV-luc）を各穴に添加し、24時間後、細胞を集め、PBSで3回洗浄した。その後、実施例2と同様にルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図8に示す。

【0059】

SeV-lucで形質転換された細胞はGL-67-pCMV-lucで形質転換された細胞より約1,000倍高いルシフェラーゼ活性を示した。

【0060】

実施例 5

ヒツジ気管上皮細胞への遺伝子導入

5-1. 粘液が遺伝子導入に及ぼす影響

粘液が各ベクターの遺伝子導入効率に及ぼす影響を天然ヒツジ気管モデルを用いて調べた。天然ヒツジ気管モデルは公知の方法に従って調製した (Kitson, C. ら, Gene Ther. 6: 534-546, 1999)。屠殺後、切除されたヒツジ気管の上皮層を筋肉と外膜に切り離し、0.5cm²の正方形切片に切断し、その後位相差顕微鏡下で繊毛運動を確認した。いくつかの組織においては、公知の方法に従い粘液を除去した (Kitson, C. ら, Gene Ther. 6: 534-546, 1999)。これらの組織を気-液界面に置き、10 μ lのSeV-luc、GL-67-lucベクター溶液を先端表面に滴下し、形質転換を行った。48時間後、実施例2と同様に、ルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図9に示す。

【0061】

図9に示されるように、GL-67-lucによる遺伝子導入と比較して、SeVによる遺伝子導入は粘液による重大な影響を受けなかった。

【0062】

5-2. 粘液の粘性が遺伝子導入に及ぼす影響

遺伝子導入の直前に種々の濃度のウシ唾液腺ムチンを加えた以外は上記5-1と同様の操作を行った。結果を図10に示す。

【0063】

図10に示されるように、GL-67-lucによる遺伝子導入はムチンの添加により阻害された。また、試料にムチンを添加した場合のルシフェラーゼ活性は無処理の細胞のルシフェラーゼ活性と有意な差はなかったことから、粘液の粘性ではなく、ムチン自体がカチオン性脂質を介した遺伝子導入の障壁になっていることが示された。一方、漿液のムチン成分はSeVによる遺伝子導入効率に影響を与えな

いが、粘性はSeVを介した形質転換に若干影響を与えることが示された。

【0064】

5-3. 部位特異的遺伝子導入効率

5-1と同様の方法で、SeV-lucまたはAdCMV-lucでヒツジ気管上皮細胞を形質転換した。遺伝子導入後、組織の端部を切開、切断し、端部及び中央部のルシフェラーゼ活性をそれぞれ測定した。結果を図11に示す。また、SeV-lucまたはAdCMV-lucの代わりに、SeV-GFPおよびCMV-IEプロモーターの支配下にあるGFPを有する高力価アデノウイルス・セロタイプ5、AdCMV-GFP (Kramer Biotech International Ltd.)を用いて、同様に遺伝子導入処理を行った。遺伝子導入の2日後、蛍光位相差顕微鏡下で緑色蛍光タンパク質 (GFP) シグナルを観察した。結果を図12に示す。

【0065】

図11及び12に示すように、ヒツジ気管組織においてAdCMV-GFPは損傷を受けた端部で高レベルで発現することが示され、損傷のない中央部では比較的发現が少ないことが確認された。一方、SeV-lucで処理した組織は、端部と中央部の遺伝子発現に大きな差を示さなかった。

【0066】

実施例6

SeV/CFTRの構築と電気生理学的特性

CFの原因遺伝子であるCFTRを発現する組換えセンダイウイルスベクターを構築した。CFTR遺伝子 (Riordan, J. R.ら、Science 245: 1066-1073, 1989) を、EおよびSシグナル配列を含むプライマーセットを用いたPCRにより増幅した。プライマーセットを以下に示す。

フォワードプライマー: 5'-acttgcggccgccaagttcaatgcagaggtcgccctctggaaaaggc cagc-3' (配列番号: 4)

リバースプライマー: 5'-atccgcggccgcatgaactttcaccctaagtttttcttactacggcta aagccttgatcttgacaccttcttctc-3' (配列番号: 5)

【0067】

増幅断片をpSeV18⁺ b(+)のNotI部位に挿入し、実施例1と同様にしてウイルス

の再構成を行った。

【0068】

調製したCFTR発現センダイウイルス(sample-1 SeV/CFTR)をCOS7細胞に感染させ、得られた感染細胞を用いて、ホールセルパッチクランプ (whole-cell patch clamp) 法による解析を行った。図13にホールセルパッチクランプ法の概略を示す。バス溶液 (bath solution) 中の細胞にピペット溶液を保持するガラスピペットを接触させ、陰圧をかけて細胞膜を取り除いた。この際、ピペット溶液は、145mM NMDG⁺、148.4 mM Cl⁻、6.7 mM Mg²⁺、5 mM ATP、10mMグルコース、0.1 mM EGTA、及び10 mM HEPES (TrisによりpH 7.4に調整した) を含有し、バス溶液は、141 mM Na⁺、152.4mM Cl⁻、152.4 mM H₂PO₄⁻、5 mM K⁺、1.7mM Mg²⁺、2 mM Ca²⁺、10 mMグルコース、0.1 mM EGTA、及び10 mM HEPES (TrisによりpH7.4に調整した) を含有する。sample-1 SeV/CFTRを発現するCOS7細胞中の膜電流におけるフォルスコリン (forskolin) の効果を、ホールセル記録法 (whole-cell recording) により調べた (図14)。その結果、フォルスコリン濃度依存的に内向き電流が観察され (下向きにトレースが下がる)、それが、グリベンクラミド (glibenclamide) (塩化物チャネル遮断剤) により抑制された (上向きに推移した)。一度洗浄した後、再びフォルスコリンを加えると内向き電流が再現され、グリベンクラミドにより再び抑制されることから、観察された電流の変化が特異的な薬剤誘導反応であることが確認された。

【0069】

次に、それぞれの薬剤誘導反応の時間依存性を調べた (図15)。sample-1 SeV/CFTRを発現するCOS7細胞において、フォルスコリンはCl⁻電流を誘導し、塩化物チャネルに特徴的な、時間非依存的な反応が観察された。グリベンクラミド (300 μM) はフォルスコリン誘導性Cl⁻電流を阻害した。

【0070】

図16は、上記のデータをもとに導き出した、sample-1 SeV/CFTRを発現するCOS7細胞におけるフォルスコリンの存在下または非存在下の電流と電圧の関係を示す。直線は、外因性のCl⁻電流がなければ原点で交差する。得られたグラフでは、直線は10~20mVで交差していた。これは、COS7細胞にCFTRにより誘導される電

流以外（フォルスコリン非依存性）の他の Cl 電流が流れていることを示唆する。

図17は、フォルスコリン投与中に記録された電流からフォルスコリン投与前に記録された電流を差し引いた、フォルスコリンの存在下および非存在下における膜電流の差異（正味の膜電流）を示す。

【0071】

産業上の利用可能性

本発明は、従来の遺伝子導入用ベクターでは十分な遺伝子導入効率を得られなかった気道上皮細胞に対して、効率よく外因性遺伝子を導入するための組換えセンダイウイルスベクター、およびそのベクターを用いた外因性遺伝子導入方法を提供する。本発明の組換えセンダイウイルスベクターは、粘液で覆われた気道上皮細胞に短時間接触させるだけで効率よく遺伝子を導入することが可能である。また、本発明のベクターは、マウス以外の大型哺乳動物に由来する気道上皮細胞に対しても感染することができる。したがって、本発明のベクターにより、気道上皮細胞への遺伝子導入が有効な遺伝子治療が可能となった。さらに、本発明のベクターは気道上皮細胞の先端表面だけでなく、CFTRが主として発現している粘膜下組織腺にも遺伝子を導入することができるので、CFTRが欠損している疾患であるCFに対する遺伝子治療に使用することが可能である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DNAVEC Research Inc.

<120> RECOMBINANT SENDAI VIRUS VECTOR FOR INTRODUCING
EXOGENOUS GENES TO AIRWAY EPITHELIA

<130> D3-105PCT

<140>

<141>

<150> US 60/163,055

<151> 1999-11-02

<150> JP 1999-359218

<151> 1999-12-17

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 1

ctttcaccct

10

<210> 2

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 2

tttttcttac tacgg

15

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 3

cggccgcaga tcttcacg

18

<210> 4

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 4

acttgccggcc gccaaagttc aatgcagagg tcgcctctgg aaaaggccag c

51

<210> 5

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 5

atccgcgcc gcgatgaact ttcacctaa gttttctta ctacggctaa agccttgat 60
cttgacctc ttcttc

76

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明の組換えセンダイウイルスベクター及びカチオン性脂質複合体のマウス肺及び鼻へのインビボにおける遺伝子導入効率を示す。エラーバーはSEMを表す。

【図 2】 マウス鼻において、鼻腔滴注（短時間接触）及び鼻腔灌流（長時間接触）により評価された本発明の組換えセンダイウイルスベクター（A）及びカチオン性脂質複合体（B）の遺伝子導入効率を示す。エラーバーはSEMを表す。

【図 3】 マウス鼻の鼻腔滴注による、本発明の組換えセンダイウイルスベクター及びアデノウイルスベクターの遺伝子導入効率を示す。エラーバーはSEM

を表す。

【図4】 本発明の組換えセンダイウイルスベクター及びアデノウイルスベクターを鼻腔滴注により導入した β -galのマウス細気管支、気管、及び鼻における遺伝子発現をX-gal染色により検出した顕微鏡写真である。

【図5】 本発明の組換えセンダイウイルスベクター及びアデノウイルスベクターを鼻腔滴注により導入した β -galのマウス気管及び鼻における遺伝子発現をX-gal染色により検出した顕微鏡写真である。NCは繊毛のない分泌細胞を、BCは基底細胞を表す。

【図6】 本発明の組換えセンダイウイルスベクターを鼻腔滴注より導入した β -galのケナガイタチ肺での遺伝子発現を示す。R1は右葉上部、R4は右葉下部、L1は左葉上部を示す。

【図7】 本発明の組換えセンダイウイルスベクターを鼻腔滴注より導入した β -galのケナガイタチ肺での遺伝子発現を示す顕微鏡写真である。図中、aは、左葉上部、bは右葉中央、cは粘膜下組織腺、dは対照である。また、Lmは気管支腔、smは粘膜下組織を示す。

【図8】 本発明の組換えセンダイウイルスベクター及びカチオン性脂質複合体のヒト健常ドナーから採取したヒト鼻上皮細胞への遺伝子導入効率を示す。エラーバーはSEMを表す。

【図9】 本発明の組換えセンダイウイルスベクター及びカチオン性脂質複合体のヒツジ気管細胞への遺伝子導入効率を示す。Fは無処理の細胞、MDは粘液を除去した細胞を表す。エラーバーはSEMを表す。

【図10】 本発明の組換えセンダイウイルスベクター及びカチオン性脂質複合体のムチン添加ヒツジ気管細胞への遺伝子導入効率を示す。Fは無処理の細胞、MDは粘液を除去した細胞を表す。エラーバーはSEMを表す。

【図11】 本発明の組換えセンダイウイルスベクター及びアデノウイルスベクターのヒツジ気管細胞の端部及び中央部への遺伝子導入効率を示す。エラーバーはSEMを表す。

【図12】 本発明の組換えセンダイウイルスベクター及びアデノウイルスベクターによりヒツジ気管細胞への導入されたGFPのシグナルを検出した顕微鏡

写真を示す。

【図13】 通常のホールセル法の形態を模式的に示す。

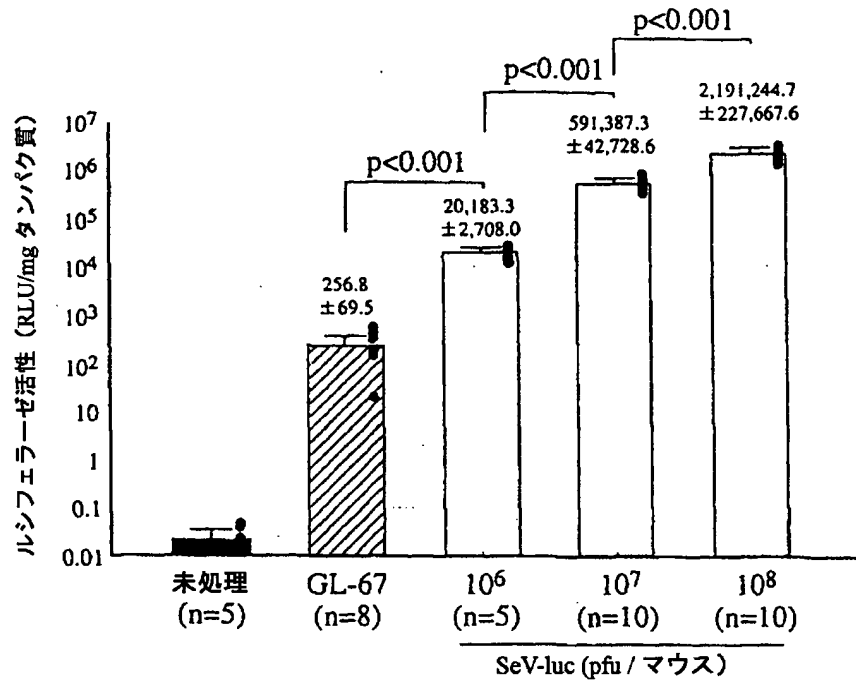
【図14】 sample-1 SeV/CFTRを発現するCOS7細胞における、 -60mV でのフォルスコリン誘導性内部電流の経時的変化を示す。膜電位は保持電位 -60mV で維持された。縦方向の振動は、15秒間隔で -100mV から $+60\text{mV}$ までの短形パルス（期間、1秒）を示す。点線は電流レベル0を示す。

【図15】 sample-1 SeV/CFTRを発現するCOS7細胞中の膜電流におけるフォルスコリンの効果を示す。膜電位は保持電位 -60mV で維持された。点線は電流レベル0を示す。グリベンクラミド ($300\mu\text{M}$) はフォルスコリン誘導性 Cl^- 電流を阻害した。

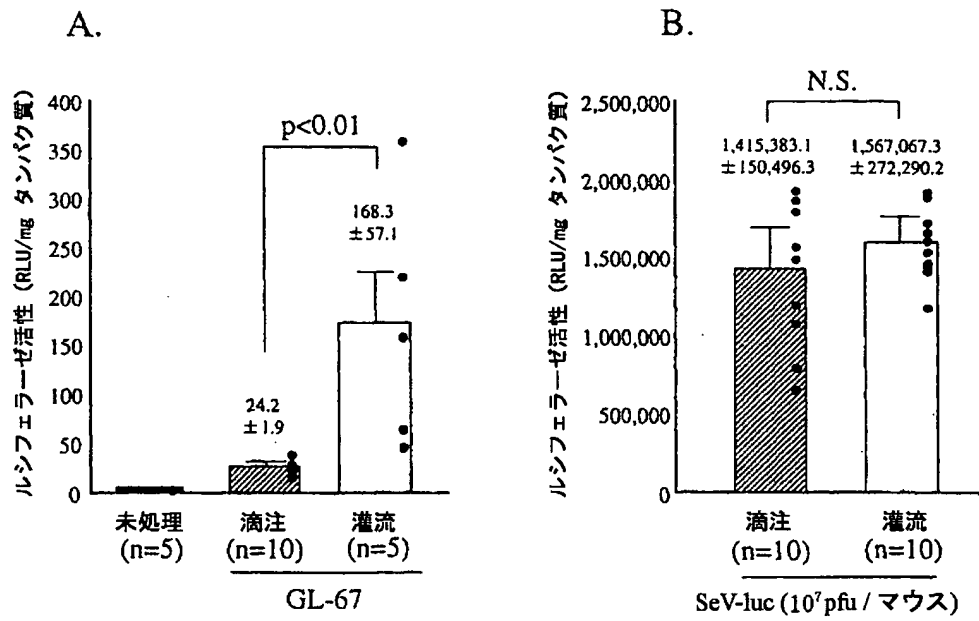
【図16】 $10\mu\text{M}$ フォルスコリンの存在下または非存在下において得られた電流と電圧の関係を示す。膜電流の振幅は、少なくとも100ミリ秒のコマンドパルス値（期間、1秒）を使用して測定した。直線は、最小二乗法により適合させた。

【図17】 sample-1 SeV/CFTRを発現するCOS7細胞において、 $10\mu\text{M}$ フォルスコリンの投与中に記録された膜電流からフォルスコリンの投与前に記録された膜電流を差し引くことによって得られた正味の膜電流を示す。膜電位は保持電位 -60mV で維持された。点線は電流レベル0を示す。

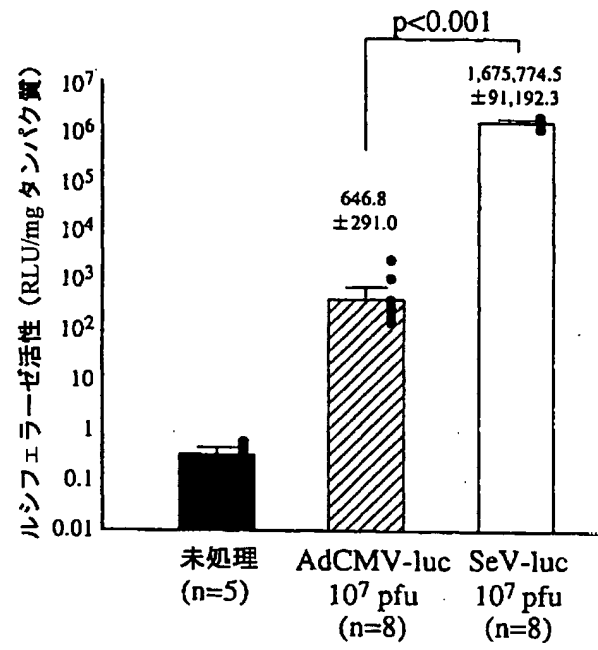
【図1】



【図2】



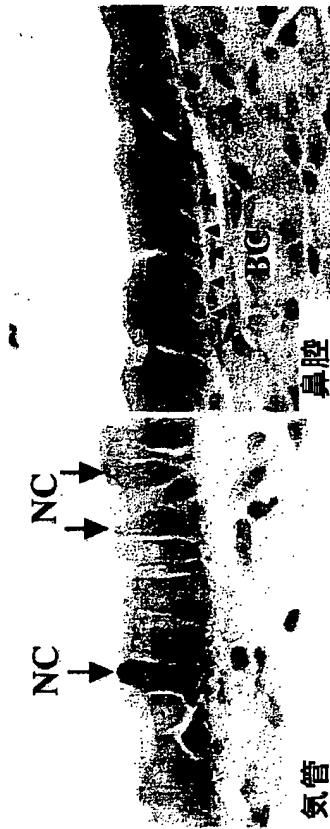
【図3】



【図4】

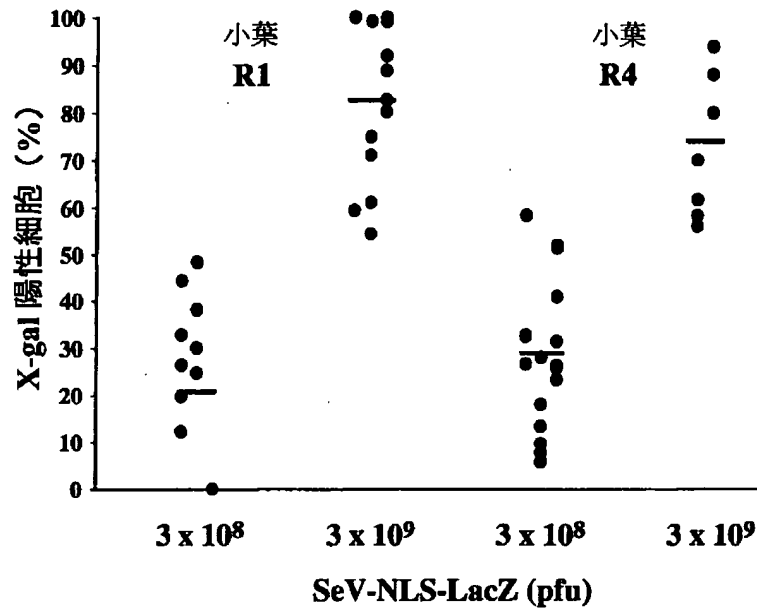


【図5】

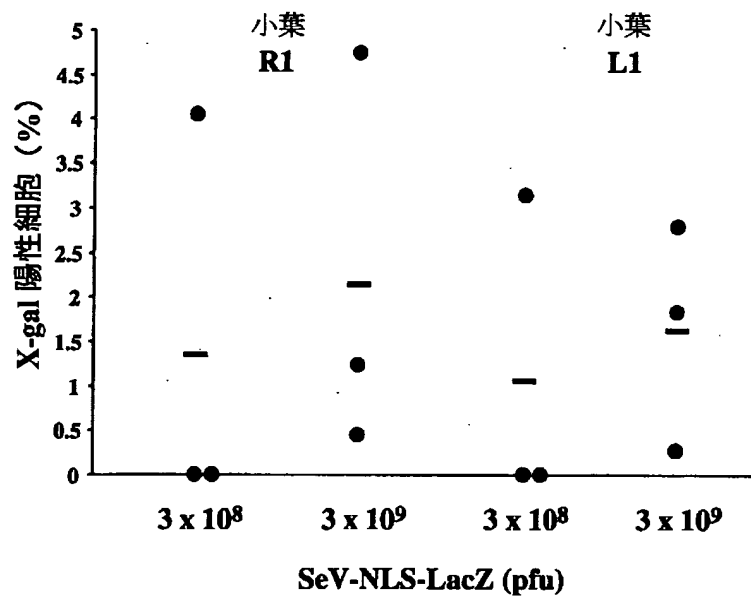


【図6】

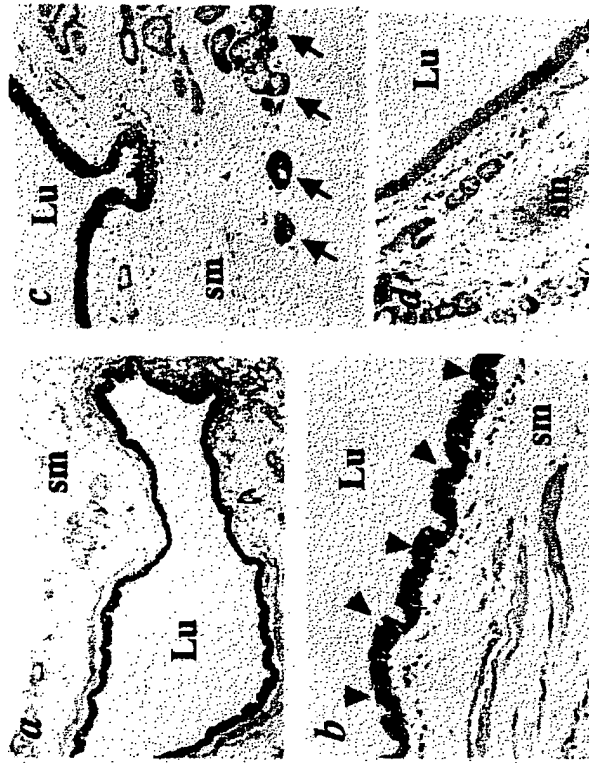
A



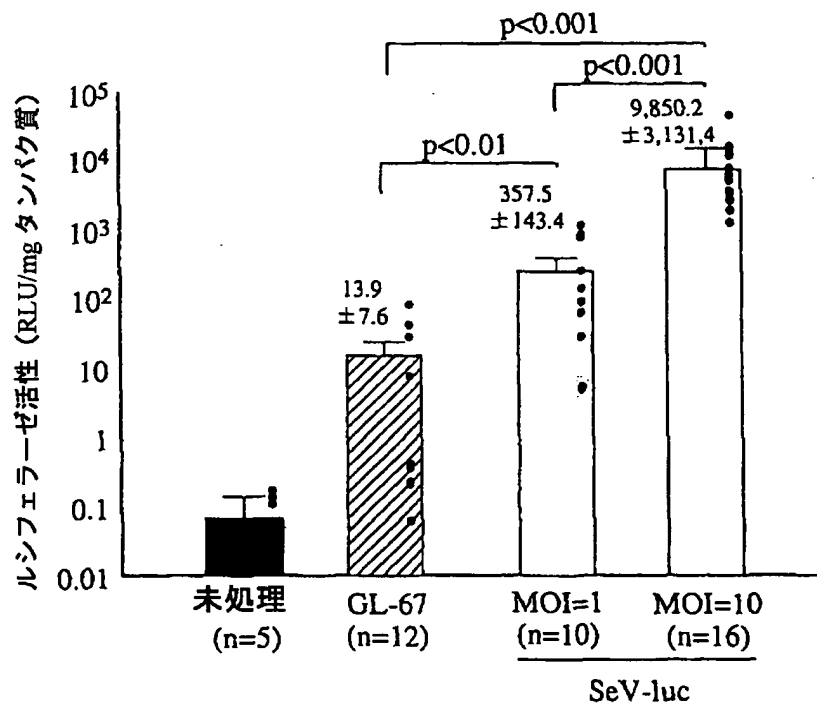
B



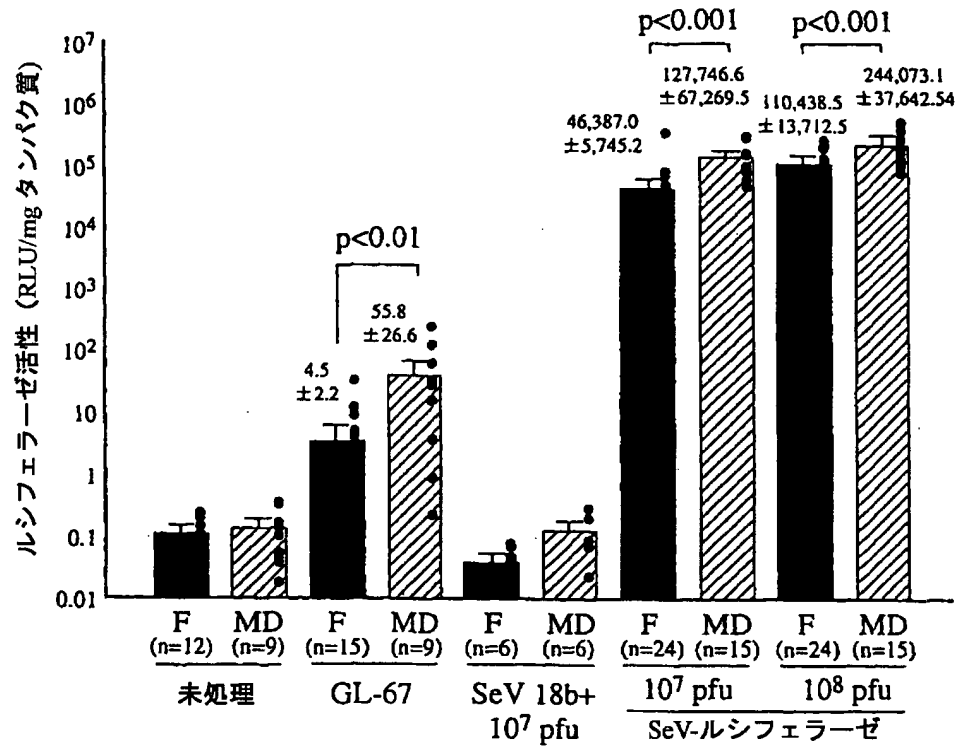
【図7】



【図8】

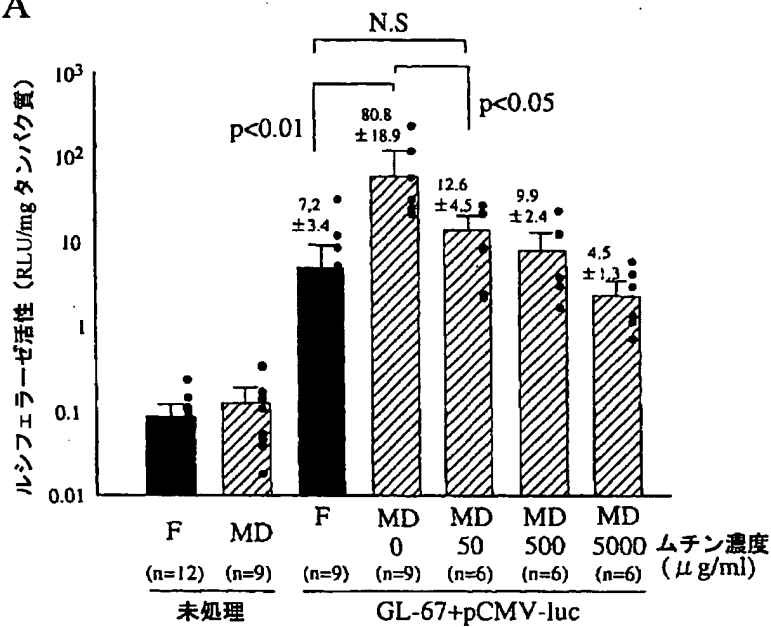


【図9】

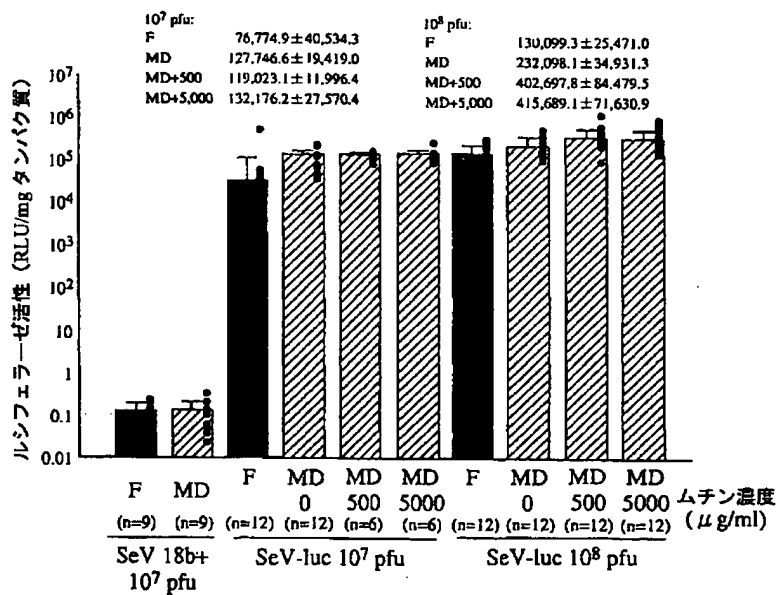


【図10】

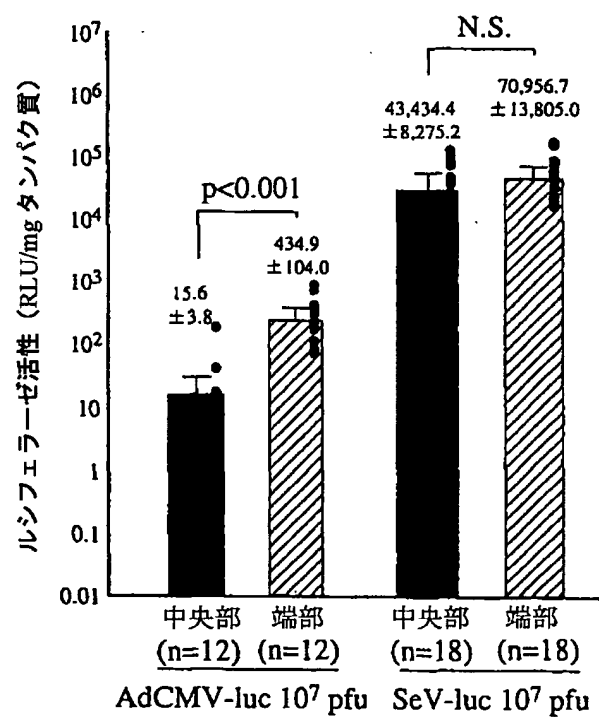
A



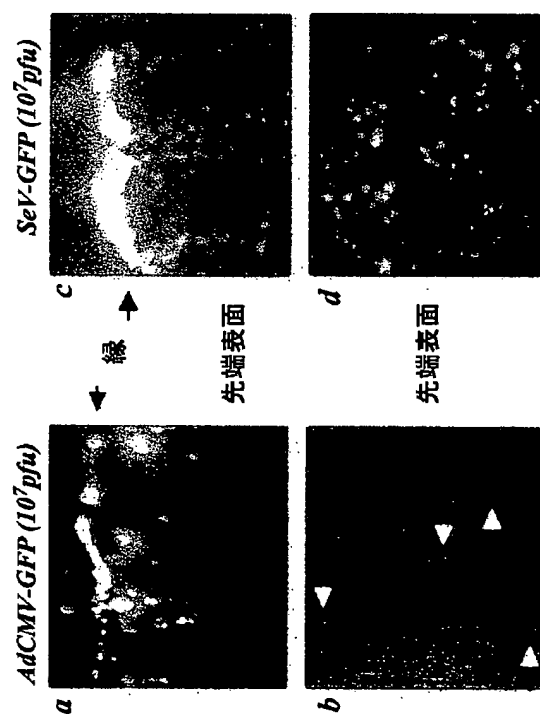
B



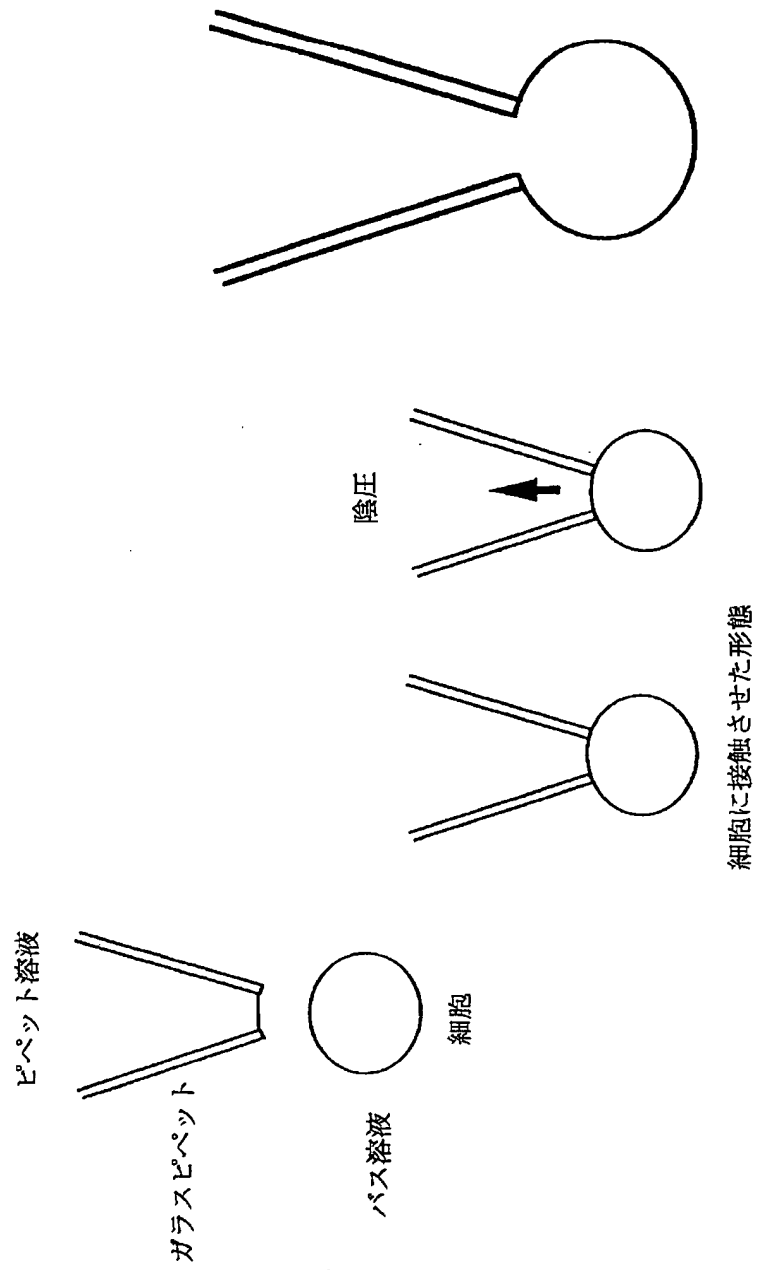
【図11】



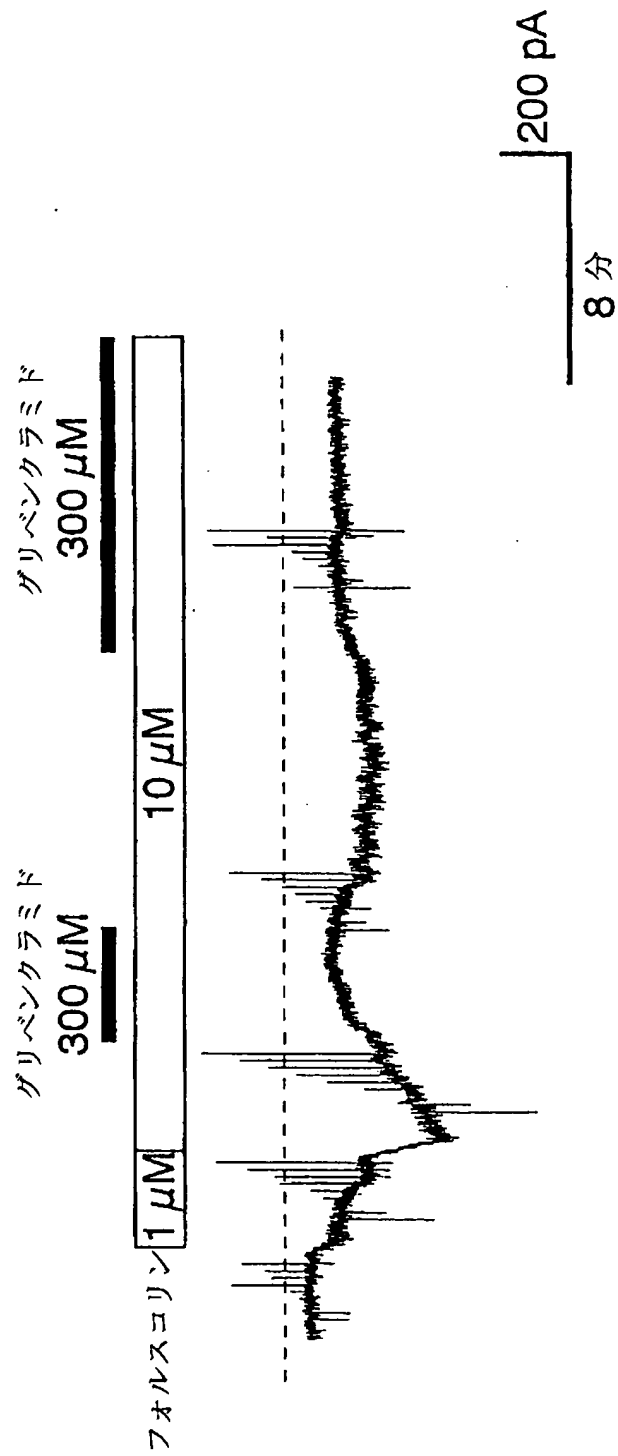
【図12】



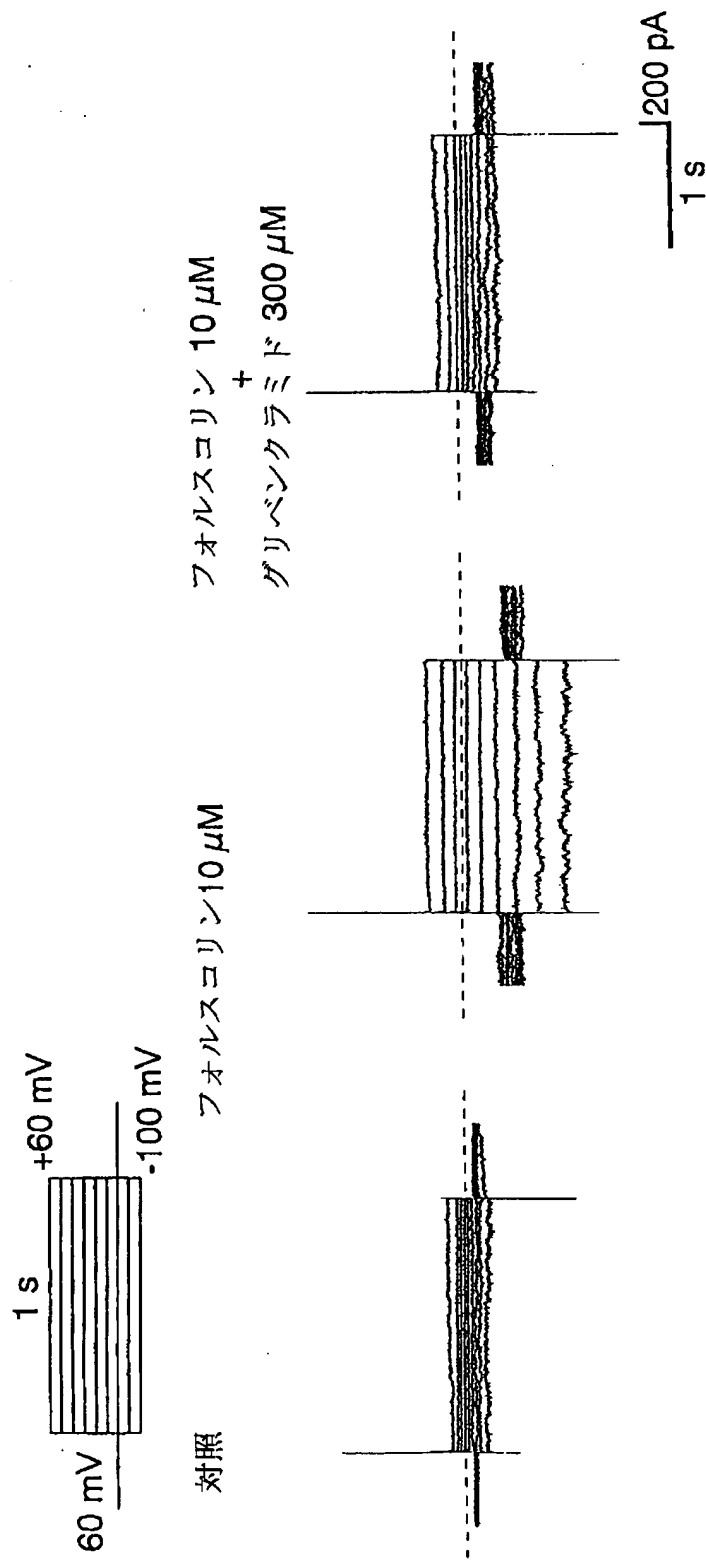
【図13】



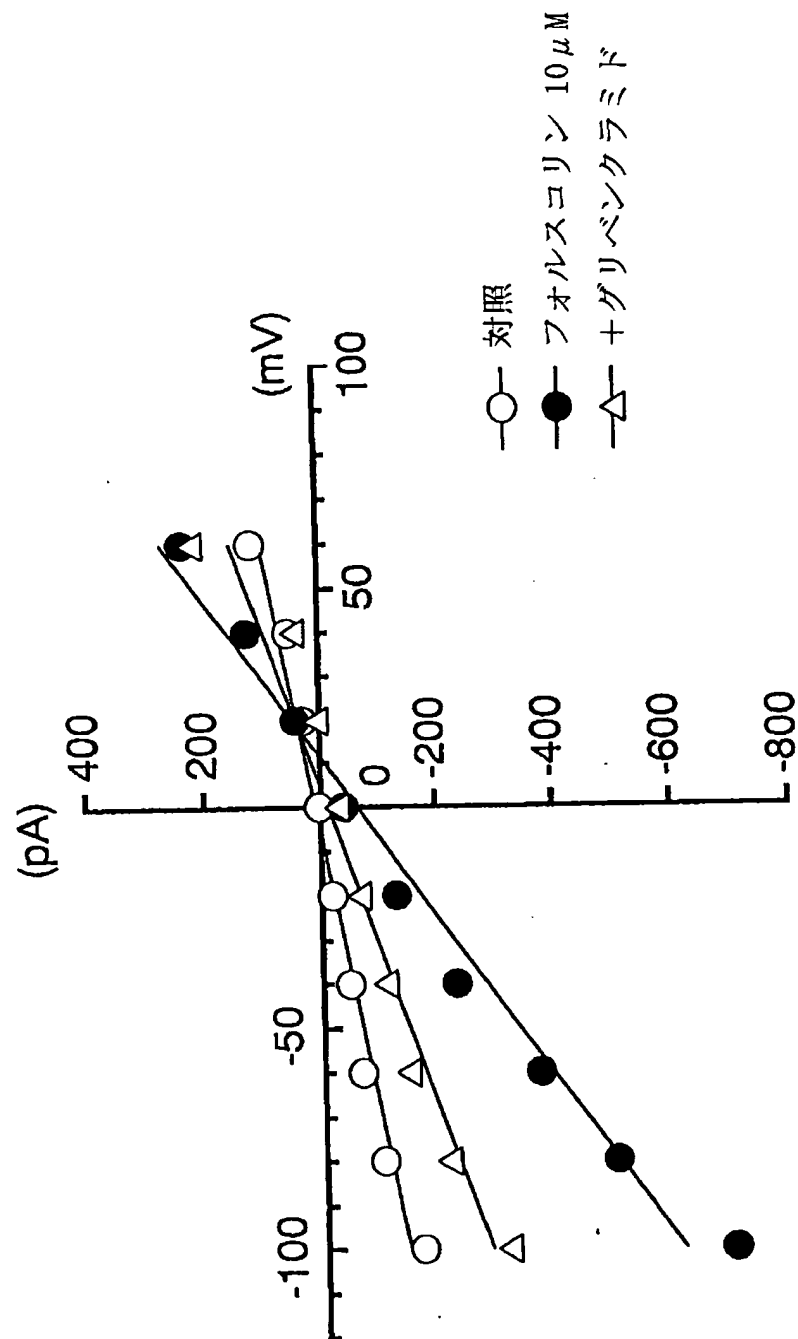
【図14】



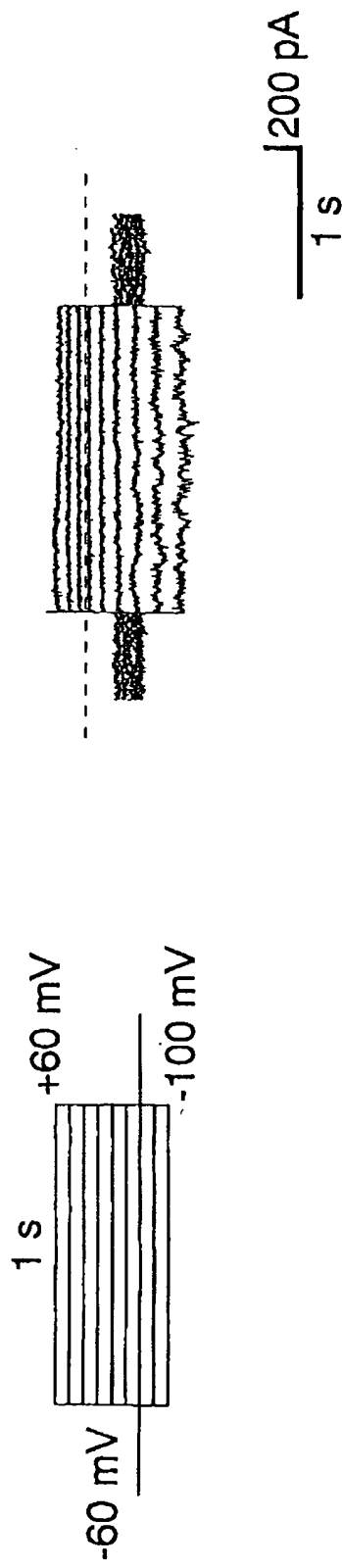
【図15】



【図16】



【図17】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP 00/07737

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C12N15/86 C12N15/12 C07K14/47 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YONEMITSU Y. ET AL.: "HVJ (Sendai virus)-cationic liposomes: A novel and potentially effective liposome-mediated technique for gene transfer to the airway epithelium." GENE THERAPY, vol. 4, no. 7, 1997, pages 631-638, XP000992923 ISSN: 0969-7128 the whole document --- -/-	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 April 2001

Date of mailing of the international search report

11/05/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5610 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tr. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Mandl, B

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP 00/07737

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HASAN M. K. ET AL.: "CREATION OF AN INFECTIOUS RECOMBINANT SENDAI VIRUS EXPRESSING THE FIRELY LUCIFERASE GENE FROM THE 3' PROXIMAL FIRST LOCUS" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 78, no. 11, 1997, pages 2813-2820, XP000886572 ISSN: 0022-1317 the whole document	1-10
A	SAEKI Y. ET AL.: "Development and characterization of cationic liposomes conjugated with HVJ (Sendai virus): reciprocal effect of cationic lipid for in vitro and in vivo gene transfer." HUMAN GENE THERAPY, vol. 8, 20 November 1997 (1997-11-20), pages 2133-2141, XP000992958 the whole document	1-10
A	SAKAI Y. ET AL.: "ACCOMMODATION OF FOREIGN GENES INTO THE SENDAI VIRUS GENOME: SIZES OF INSERTED GENES AND VIRAL REPLICATION" FEBS LETTERS, vol. 456, 6 August 1999 (1999-08-06), pages 221-226, XP000887286 ISSN: 0014-5793 the whole document	1-10
P,X	YONEMITSU Y. ET AL.: "Efficient gene transfer to airway epithelium using recombinant Sendai virus." NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 18, no. 9, September 2000 (2000-09), pages 970-973, XP002165781 ISSN: 1087-0156 the whole document	1-10

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
A 61 P 43/00	1 0 1	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 5/10		5/00	B

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, G M, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, B Z, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, J P, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, R U, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 エリック ダブリューエフダブリュー オールトン
英国 ロンドン マンレサロード エマニ
ュエル ケイ ビルディング インベリア
ル カレッジ スクール オブ メディシ
ン内

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA04 CA11 EA02 HA17
4B065 AA90 AB01 BA02 CA44
4C084 AA13 CA01 MA05 MA56 MA59
ZA59 ZC54
4C087 AA01 AA02 BC83 MA05 MA56
MA59 NA14 NA20 ZA59 ZC54